超声与表面活性剂对维生素 K_2 渗漏发酵的协同作用研究

赵根海，杨强，方雪，刘会，孙小雯，倪文枫，郑之明*

中国科学院合肥物质科学研究院，技术生物与农业工程研究所

摘要：维生素K_2是一种人体必需维生素，具有促进凝血酶原产生和骨钙素合成等作用，在损伤细胞修复方面也有明显效果。微生物发酵法制备维生素K_2具有环境影响小、生物活性高、生产成本低等优点，是维生素K_2规模化制备的发展趋势。利用超声波和表面活性剂提高微生物发酵过程中菌体细胞通透性是一种常见的细胞代谢人工调控方法。低功率超声波的空化作用可以在细胞表面瞬间造成微伤，使细胞膜局部破裂从而改变细胞膜的通透性，有利于胞内物质释放或胞外物质进入细胞内。表面活性剂有助于提高营养物质溶解性，降低培养基表面张力，减小菌体表面和培养基的界面阻力，从而促进营养物质和菌体代谢产物的跨膜传输。

本文对实验室保藏的一株产维生素K_2黄杆菌（*Flavobacterium*.sp）Fla-M进行低功率超声波辐照和表面活性剂处理，考察二者在提高细胞渗漏发酵方面的协同作用。首先在500 mL摇瓶中对Fla-M进行表面活性剂（聚氧乙烯油醚POE）添加时间和添加浓度优化，发现在发酵起始阶段添加1%POE效果最佳，发酵结束时生物量为13.4 g/L，胞外维生素K_2产量为36.3 mg/L，相比于未添加POE的对照组（生物量7.32 g/L，胞外维生素K_2 0.85 mg/L）分别提高了83.5%和41倍，扫描电镜观察发现在添加POE发酵的菌体表面聚集了大量表面活性剂胶团，由于POE与细胞膜磷脂分子结构相似，二者可能相溶形成混合胶束改变了细胞膜结构，进而改善细胞膜的通透性。其次在500 mL摇瓶中对Fla-M进行了超声方式、超声时机、超声功率以及作用时间研究，发现在菌体生长稳定期（发酵第5 d）、120 W 20 KHz条件下，插入式超声98 S（每次3 S，间隔4 S）效果最佳，发酵结束时生物量为11.1 g/L，胞外维生素K_2达到50.1 mg/L, 相比于未超声对照组（生物量7.32 g/L，胞外维生素K_2 0.85 mg/L），分别提高了51.6%和58倍。透射电镜观察发现超声波处理后尽管细胞膜完整但磷脂双分子层界限模糊，且细胞膜表面有孔状破损结构，可见疑似内容物外渗现象。在上述最优条件下，在500 mL摇瓶中综合运用POE和超声的处理方法，生物量和胞外维生素K_2产量在发酵6 d后达到最大值，分别为生物量11.5 g/L，胞外维生素K_2 59.7 mg/L，较单独运用POE或超声的方法发酵周期缩短3 d、胞外维生素K_2产量分别提高64.4%和19.1%。运用排斥性染料碘化丙啶(PI)对发酵后细胞进行流式细胞仪检测，设001号为阴性对照，即未加荧光载体的未处理菌体的荧光信号；002号为处理的菌体加荧光载体的荧光信号；003号为未处理菌体加荧光载体的荧光信号；004号为阳性对照，即死细胞加荧光载体的荧光信号，阴性对照的001号菌体自发荧光区域以外的面积M1占总面积的比例预设为0，结果显示004号的M1占总面积的比例17.21%>002号M1占总面积的比例8.89%>003号M1占总面积的比例1.21%，说明死菌体的细胞膜通透性>渗漏培养菌体的细胞膜通透性>无渗漏培养菌体的细胞膜通透性，验证了经超声和表面活性剂处理后，菌体细胞膜通透性大幅提高。本研究对发酵法制备维生素K2的产业化开发具有一定的借鉴意义。

关键词：超声，表面活性剂，维生素 K_2，渗漏发酵

作者简况：赵根海，1975.08，博士，任职于中国科学院合肥物质科学研究院，副研究员，Tel：13865933486，E-mail：zhgh327@ipp.ac.cn